

ラット体細胞核移植胚の大概発生能に影響する要因の解析

著者	菅原 淳史
号	45
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第963号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60271

すがわら あつし

氏名（本籍地） 菅 原 淳 史

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 963 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 21 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科応用生命科学専攻

論 文 題 目 ラット体細胞核移植胚の体外発生能に影響する要因の解析

博士論文審査委員 （主査）教 授 佐 藤 英 明

教 授 山 口 高 弘

教 授 西 森 克 彦

論文内容要旨

緒言

ラットは産業動物のモデル動物であり、応用動物科学・獣医学分野における生理学研究の発展に貢献している。またヒトや家畜の疾患モデル動物として、様々な研究に利用されている。例えば高血圧症ラット・早老性ラットなどが作出されており、心臓血管系、内分泌系及び神経系に関わる疾病の解明において、最も多用されているモデル動物の一つである。そのため多様なモデル動物の作出が期待されている。モデル動物を作出するための遺伝子改変技術としては、受精胚に直接遺伝子を導入する前核注入法、胚性幹細胞 (ES) 細胞の遺伝子を相同組換えにより改変し、キメラ個体を介して遺伝子改変動物を作製する方法、また遺伝子改変した体細胞をドナーとして体細胞核移植 (SCNT) により遺伝子改変クローン個体を作出する方法が挙げられる。しかしながら、前核注入法は遺伝子改変動物の作出効率が低い欠点がある。また ES 細胞を用いる方法は、マウス以外の ES 細胞が樹立されていない動物種では確立されていない。このことから SCNT を用いた手法は、ラットにおける遺伝子改変動物を作出するための極めて有効な技術となり得る。以上のことから、ラットにおける SCNT 技術の確立が必要とされている。

体細胞核は除核した MII 期卵母細胞 (卵子) に注入した際、高 MPF 活性により核膜崩壊 (NEBD)、早期染色体凝集 (PCC) および紡錘体を形成し、初期化因子に曝露される。特に齧歯類の SCNT 胚においては、NEBD および PCC の形成がクローン個体の作出に必要な不可欠であると考えられている。ラット MII 期卵子は体外に取り出すと直ちに、自発的に MPF 活性が低下する性質を持つ。この性質により、ラット MII 期卵子をレシピエントとした SCNT 胚では、正常な PCC が誘起されないことが報告されており、このことがラットクローン個体の作出が困難な要因であると考えられてきた。一方でプロテアゾームの阻害剤である MG132 により MPF 活性の低下を抑制した MII 期卵子をレシピエントとし、体細胞分裂中期(M 期)の胎子線維芽細胞を注入することにより、ラットクローン個体の作出が報告された。しかしながら、我々を含む多くの研究チームがこの実験の追試を試みたが、これまでにラットクローン個体の作出および SCNT 胚の胚盤胞期までの体外発生は認められていない(表 1, 2 および 3)。このことから、ラットに特有のクローン個体の作出が困難である要因が存在することが示唆される。これまでにその要因の解明が試みられてきたが、ラット SCNT 胚が 2 細胞期で体外発生を停止し、胚盤胞期まで発生が可能な体外培養系が存在しないことから、その要因を解明することが不可能であった。そこで本研究では、ラット SCNT 胚の体外培養系を確立するとともに、体外発生能に影響を及ぼす要因を解明することを目的とした。

1. ブタ MII 期卵子をレシピエントとした異種間体細胞核移植技術によるラット体外培養系の確立

本実験では、ブタ MII 期卵子をレシピエントとした異種間体細胞核移植 (iSCNT) 技術を用いてラット体外培養系の確立を試みた。さらにラット SCNT 胚の発生に影響を及ぼす要因の絞込みとして、(1) 胎子線維芽細胞および卵丘細胞のいずれがドナー細胞として適しているか、(2) 正常な PCC および紡錘体形成が体外発生能に影響を及ぼす要因であるか、検索を行った。

1-1. ブタ MII 期卵子をレシピエントとしたラット体細胞核移植胚の体外発生能の解析

ブタ MII 期卵子をレシピエントとして、ラット Green fluorescence protein (GFP) 胎子線維芽細胞および卵丘細胞を移植することにより、iSCNT 胚を作製し体外発生能を調べた。その結果、GFP 胎子線維芽細胞

胞および卵丘細胞を用いた iSCNT 胚において、胚盤胞期までの発生が認められた(表 4)。さらに、GFP 胎子線維芽細胞を用いて作製した場合、胚盤胞期に GFP 蛍光が認められた(図 1)。また、ドナー細胞種の相違によって胚盤胞期への発生率に有意差は認められなかった。胚盤胞の平均細胞数は、ドナーに GFP 胎子線維芽細胞を用いた場合が有意に高かった。以上の結果、ラット SCNT のドナー細胞として、GFP 胎子線維芽細胞が適していることが示された。

1-2. ブタ MII 期卵子をレシピエントとしたラット体細胞核移植胚における紡錘体形成能の解析

ブタ MII 期卵子に GFP 胎子線維芽細胞および卵丘細胞を注入した後の NEBD、PCC 出現率を調べた。その結果、NEBD 出現率は GFP 胎子線維芽細胞を用いた場合で有意に高かった(図 2)。また PCC 出現率は GFP 胎子線維芽細胞および卵丘細胞を用いた場合で、ほぼ同じ値であった。正常な紡錘体形成の出現率は、GFP 胎子線維芽細胞を用いた場合が有意に高かった(図 3)。以上の結果、ドナー細胞として GFP 胎子線維芽細胞を用いることで正常な紡錘体形成が誘起できることが示された。

本章の結果より、ラット体細胞核は胚盤胞期までの発生能を有していること、またラット SCNT 胚が胚盤胞期まで発生を進行するためには、正常な PCC および紡錘体形成を誘起することが必要条件であり、さらに高品質の胚盤胞を得るためには GFP 胎子線維芽細胞を用いることが有効であることが示された。

2. ラット体細胞核移植胚の発生停止要因の解明

—早期染色体凝集および紡錘体形成の経時的観察—

前章の結果から、ラット SCNT 胚が胚盤胞期まで発生を進行するためには、正常な PCC および紡錘体形成を誘起する必要があることが示された。そこで本章ではラット MII 期卵子をレシピエントとした SCNT 胚において、融合後の紡錘体形成の変化を経時的に観察することによって、紡錘体形成の異常が発生停止の要因であるか否か調べた。

2-1. 融合後の経過時間がラット体細胞核移植胚における核の紡錘体形成に及ぼす影響

ラット MII 期卵子に胎子線維芽細胞を融合させ、1, 3, および 4.5 時間後のドナー核の形態変化を調べた。その結果、NEBD 出現率は融合後 1 時間の実験区が、3, 4.5 時間と比較して有意に高かった(図 4)。PCC 出現率は融合後 3, 4.5 時間の実験区が、1 時間と比較して有意に高かった。正常な紡錘体形成の出現率は 3, 4.5 時間の実験区が、1 時間と比較して有意に高かった(図 5)。以上の結果、ラット SCNT 胚において融合後 1 時間までに NEBD が形成され、さらに融合後 4.5 時間までに PCC および紡錘体形成が進行することが示された。

2-2. 早期染色体凝集および紡錘体形成がラット体細胞核移植胚の体外発生能に及ぼす影響

PCC および紡錘体形成がラット SCNT 胚の体外発生能に及ぼす影響を明らかにするために、融合後 1, 3, 4.5 時間後の SCNT 胚を薬剤により活性化し、その後の体外発生能を調べた。その結果、卵割率は融合後 1, 3, 4.5 時間においてほぼ同じであり、4 細胞期以降の発生は認められなかった(表 5)。このことから、PCC および紡錘体形成は、2 細胞期までの体外発生能に影響を及ぼしていないことが示された。

本章の結果から、ラット SCNT 胚において正常な PCC および紡錘体形成が認められ、発生停止の要因はこれらの異常ではないことが示された。

3. ラット体細胞核移植胚の発生停止要因の解明

—ヒストンアセチル化状態の解析—

前章より、ラット SCNT 胚の発生停止の要因は PCC および紡錘体形成の異常に起因しないことが示された。そこで本章では発生停止要因についての更なる解析を行うために、ラット SCNT 胚の核のヒストンアセチル化状態に着目し解析を行った。

3-1. ラット体細胞核移植胚における核のアセチル化ヒストン 3 lysine 9(AcH3K9) の免疫細胞化学による観察

ラット SCNT 胚の前核期、早期 2 細胞期そして後期 2 細胞期における核の AcH3K9 の観察を行った。その結果、ラット SCNT 胚では、受精胚と比較して各ステージでヒストンアセチル化状態が異なっており、前核期では低アセチル化状態にあった。一方で、早期 2 細胞期および後期 2 細胞期では高アセチル化状態にあった(図 6, 7)。ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である Trichostatin A (TSA) で処理したラット SCNT 胚では、ヒストンアセチル化状態は受精胚と同様に、前核期に最も高いアセチル化状態を示し、早期 2 細胞期および後期 2 細胞期に発生するにしたがって、アセチル化状態が低下した(図 6, 7)。以上の結果、ラット SCNT 胚のヒストンアセチル化状態は受精胚と異なっており、TSA 処理によって、前核期におけるヒストンアセチル化レベルを受精胚に近づけることが可能であることが示された。

3-2. Trichostatin A 処理した SCNT 胚の体外発生能

ヒストンアセチル化状態の相違が発生能に及ぼす影響を明らかにするために、TSA 処理の有無による体外発生能の相違を調べた。その結果、ラット SCNT 胚は TSA 処理を行うことにより、卵割率に有意差は認められなかったものの、4 細胞期への発生が認められた(表 6)。このことから、TSA 処理により 4 細胞期までの体外発生能が改善される可能性が示された。

本章の結果より、ラット SCNT 胚の初期発生におけるヒストンアセチル化状態は受精胚と比較して前核期で低く、特に早期 2 細胞期以降で高く推移する点が異なっており、そのヒストンアセチル化状態の異常が、体外発生能が低い一因であることが示唆された。

総括

ラット SCNT 胚の体外発生に影響を及ぼす要因を解明することを目的とした本実験の結果、

1. ラット体細胞核は胚盤胞期までの発生能を有していること、またラット SCNT 胚が胚盤胞期まで発生を進行するためには、正常な PCC および紡錘体形成を誘起することが必要条件であり、さらに高品質の胚盤胞を得るためには GFP 胎子線維芽細胞を用いることが有効であること
2. ラット SCNT 胚における発生停止の要因は、PCC および紡錘体形成の異常ではないこと
3. ラット SCNT 胚の初期発生におけるヒストンアセチル化状態は受精胚と比較して異なっており、そのヒストンアセチル化状態の異常が、体外発生能が低い一因であることが明らかとなった。

以上のことから、ラット SCNT 胚では、正常な PCC および紡錘体形成が誘起され、卵細胞質の初期化因子に曝露されていると推察されるものの、ヒストンアセチル化状態に異常が生じ、4 細胞期以降の体外発生が停止している可能性が示された。

本研究は、iSCNT 技術を用いることにより、ラット SCNT 胚の体外培養系を確立するとともに、体外発生に影響する要因としてヒストンアセチル化状態の関与を示唆した。本研究で得られた成果は、今後のラット体細胞クローン研究において極めて有効な知見であると確信している。

表1. MG132処理がラットSCNT胚の体外発生能に及ぼす影響

作製した SCNT胚数	前核形成数(%)	各ステージに発生したSCNT胚数(%)	
		2細胞	4細胞
60	32 (53)	14 (23)	0 (0)

表2. G₀/G₁期およびM期胎子線維芽細胞により作製したラットSCNT胚の体外発生能

活性化法	細胞周期	供試 卵子数	融合 卵子数(%) ¹	極体 放出数(%) ²	前核 形成数(%) ²	各ステージに発生した SCNT胚数 (%) ²	
						2細胞	4細胞
I ₀ + BL-I + 6-DMAP	G ₀ /G ₁	84	79 (94.0) ^a	1 (1.5) ^b	74 (93.7) ^a	25 (31.6) ^{a*}	0 (0) [*]
	M	215	101 (47.0) ^c	30 (29.7) ^a	76 (75.2) ^b	10 (33.3) ^{a**}	0 (0) ^{**}
I ₀ + 6-DMAP	G ₀ /G ₁	94	75 (82.1) ^b	7 (10.1) ^b	57 (76.0) ^b	32 (47.1) ^{a*}	0 (0) [*]
	M	79	37 (46.8) ^c	0 (0) ^b	32 (86.5) ^{ab}	0 (0) ^{**}	0 (0) ^{**}

1: 供試卵子数に対する割合. 2: 融合卵子数に対する割合.

*: 極体を放出しなかったSCNT胚数に対する割合. **: 極体を放出したSCNT胚数に対する割合.

a-c: 各項目内で異符号間に有意差($P < 0.05$).

表3. M期胎子線維芽細胞により作製したラットSCNT胚の
体内発生能

仮親数	作製した SCNT胚数	着床痕数(%)	産子数(%)
3	39	1 (2.6)	0 (0)

表4. ブタMII期卵子をレシピエントとしたラットiSCNT胚の体外発生能

ドナー細胞種	作製した iSCNT胚数	各ステージに発生したiSCNT胚数 (%)					細胞数 平均値±S.D.
		2細胞	4細胞	8細胞	桑実胚	胚盤胞	
GFP胎子 線維芽細胞	124	52 (41.9)	23 (18.5)	9 (7.3)	8 (6.5)	7 (5.6)	32.3±4.2 ^a
卵丘細胞	112	45 (40.2)	16 (14.3)	4 (3.6)	3 (2.7)	3 (2.7)	12.7±0.9 ^b

a, b: 異符号間に有意差($P<0.05$).

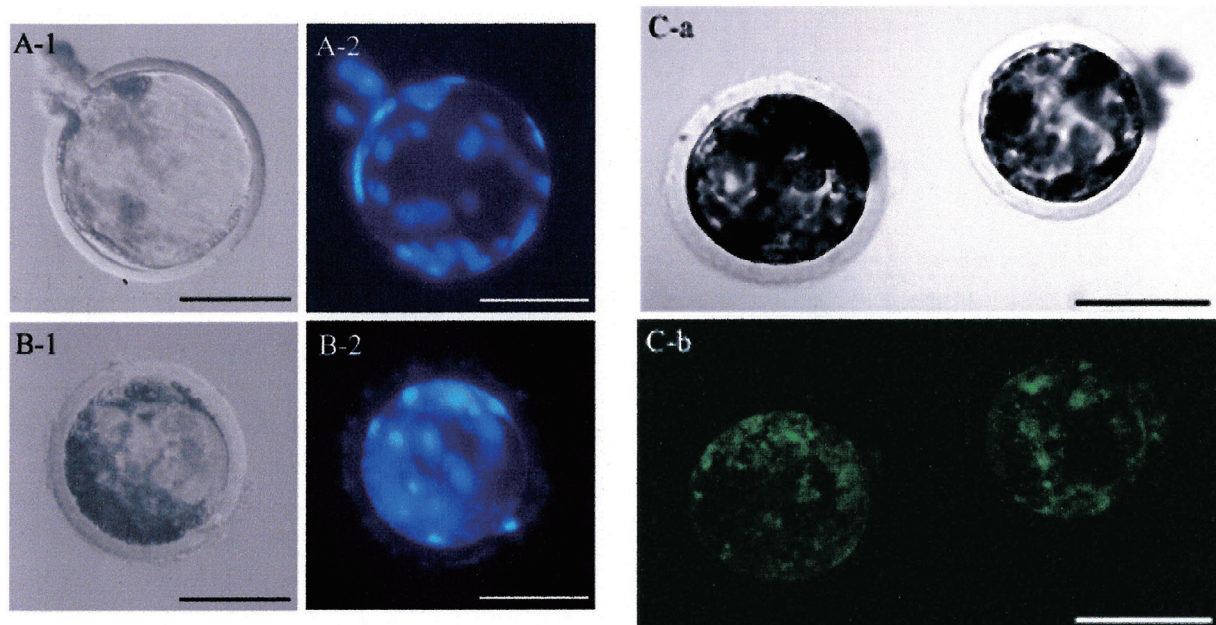


図1. GFP胎子線維芽細胞(AおよびC) および卵丘細胞(B) により作製したラットiSCNT胚の胚盤胞期における実像(A-1, B-1, およびC-a), 総細胞(A-2, およびB-2) およびGFP発現(C-b). Bar=100 μ m

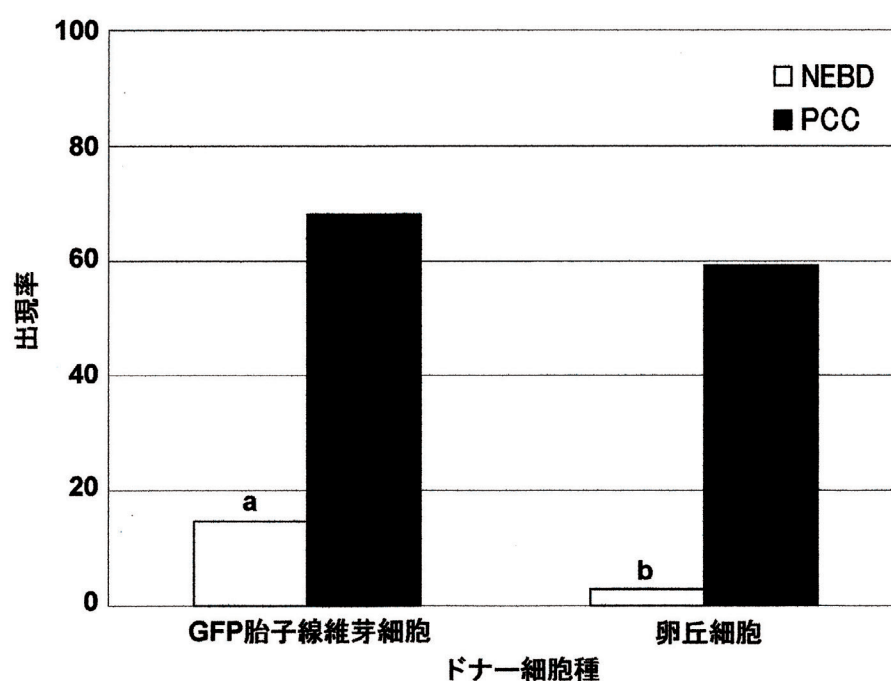


図2. ブタMII期卵子をレシピエントとしたラットiSCNT胚におけるNEBDおよびPCCの出現. a, b: 異符号間に有意差($P<0.05$).

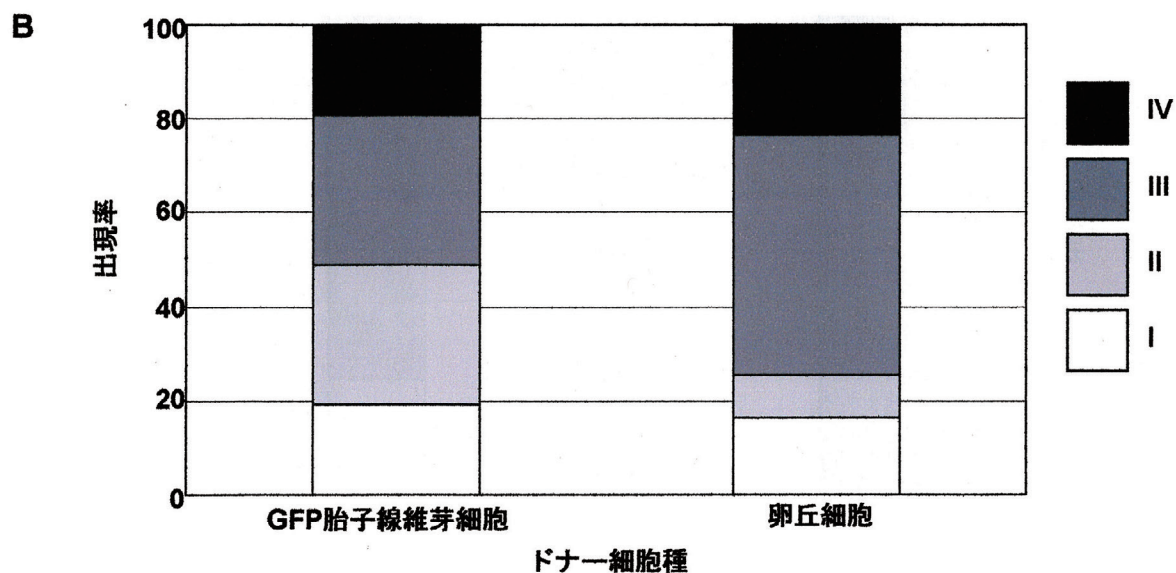
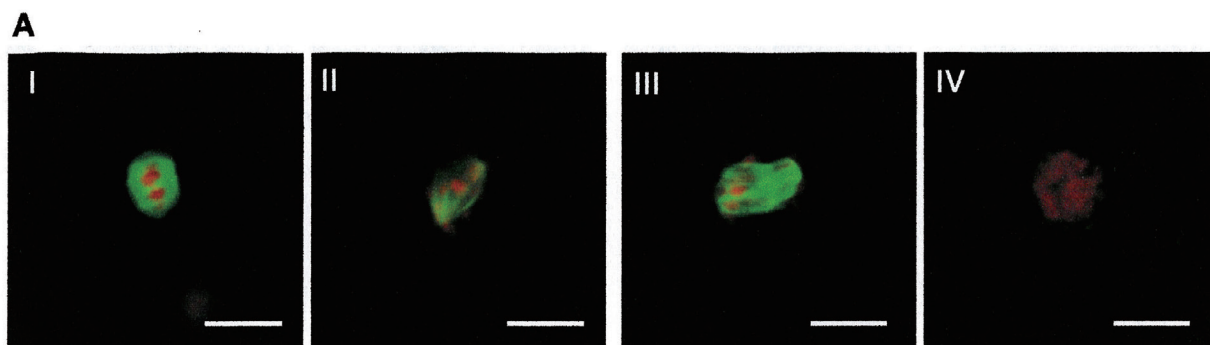


図3.ブタMII期卵子をレシピエントとしたラットiSCNT胚におけるドナー核の注入後の紡錘体形成(A)およびその出現率(B). I: 正常な紡錘体とPCCを形成したもの. II: 正常な紡錘体形成と異常なPCCを形成したもの. III: 正常な紡錘体とPCCが形成されなかったもの. IV: 紡錘体を形成しなかったもの. Bar=10 μ m.

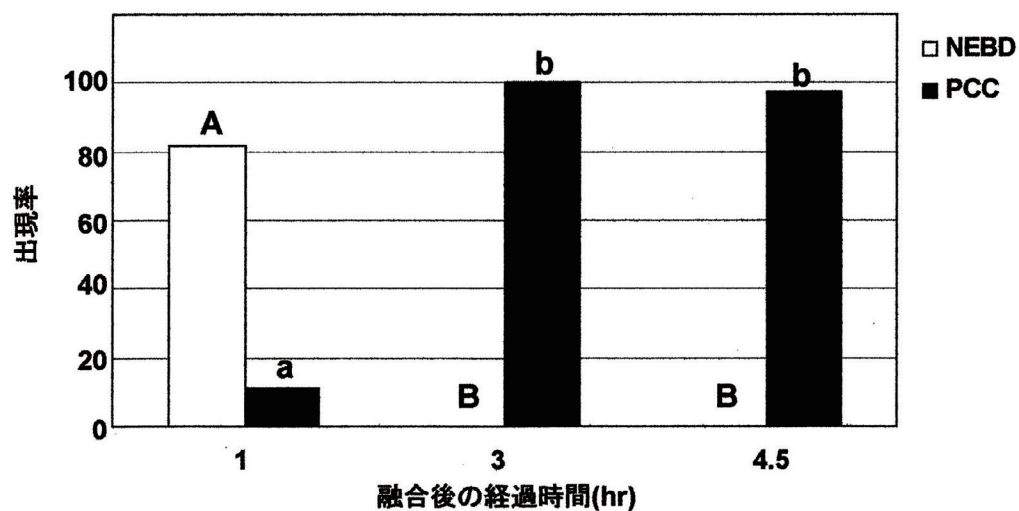


図4. ラットSCNT胚におけるNEBDおよびPCCの出現率. A-B, a-b: 異符号間に有意差($P < 0.05$).

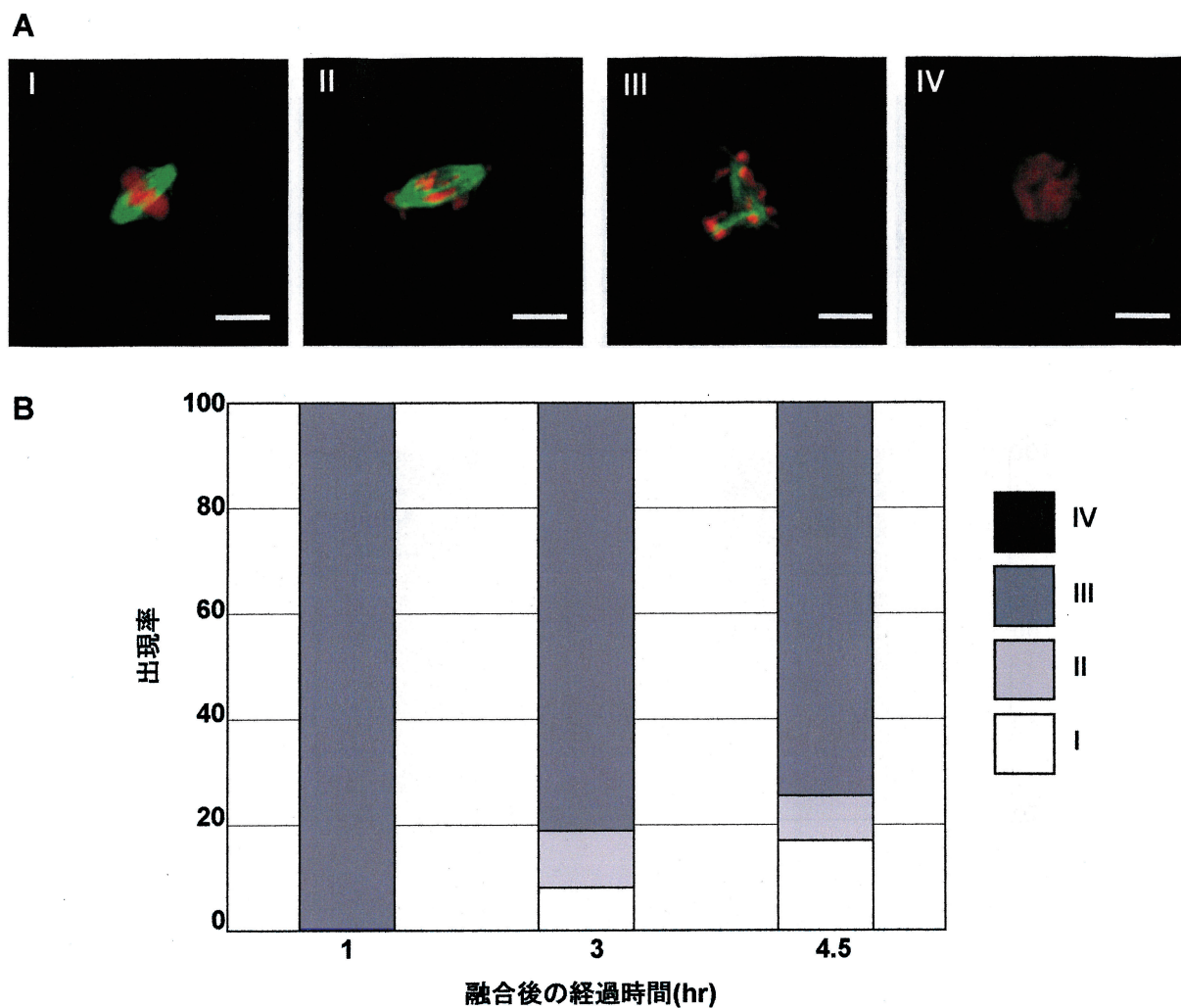
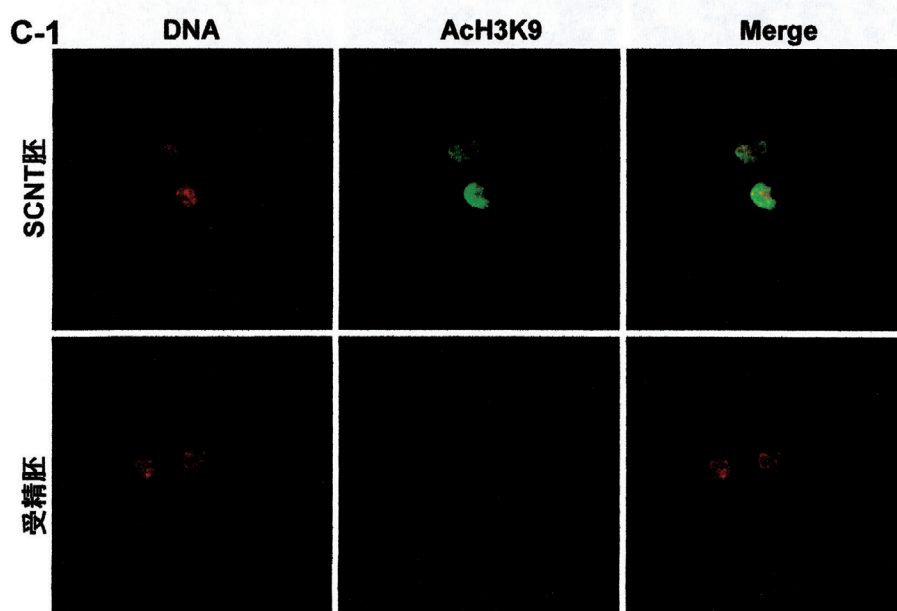
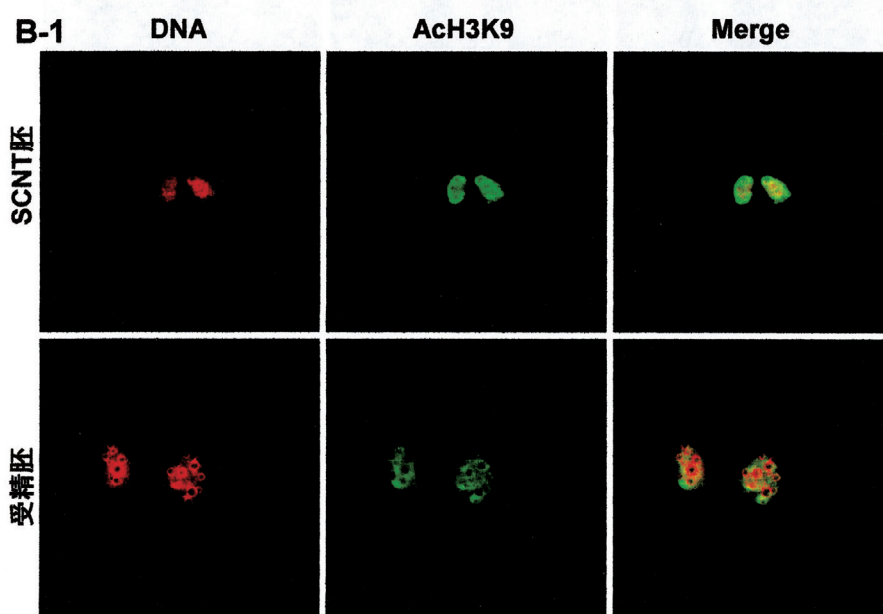
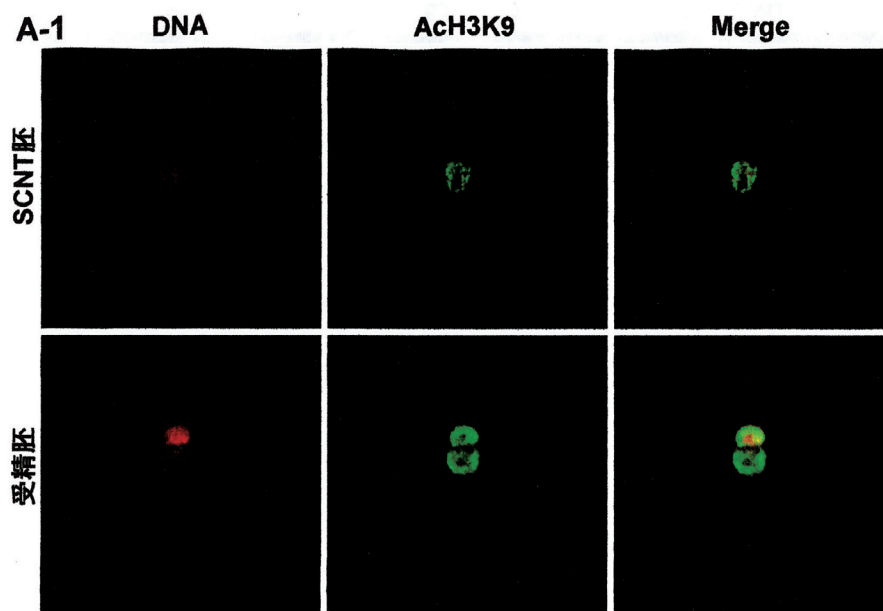


図5.ラットSCNT胚におけるドナー核の注入後の紡錘体形成(A)およびその出現率(B)。I：正常な紡錘体とPCCを形成したもの。II：正常な紡錘体形成と異常なPCCを形成したもの。III：正常な紡錘体とPCCが形成されなかったもの。IV：紡錘体を形成しなかったもの。Bar=10 μ m.

表5. PCCおよび紡錘体形成がラットSCNT胚の体外発生能に及ぼす影響

融合後の経過時間	作製したSCNT胚数	前核形成(%)	各ステージに発生したSCNT胚数 (%)	
			2細胞	4細胞
1	126	95 (75.4) ^a	66 (52.4)	0 (0)
3	42	23 (54.8) ^b	16 (38.1)	0 (0)
4.5	42	27 (64.3) ^{ab}	18 (42.9)	0 (0)

a, b : 異符号間に有意差($P < 0.05$).



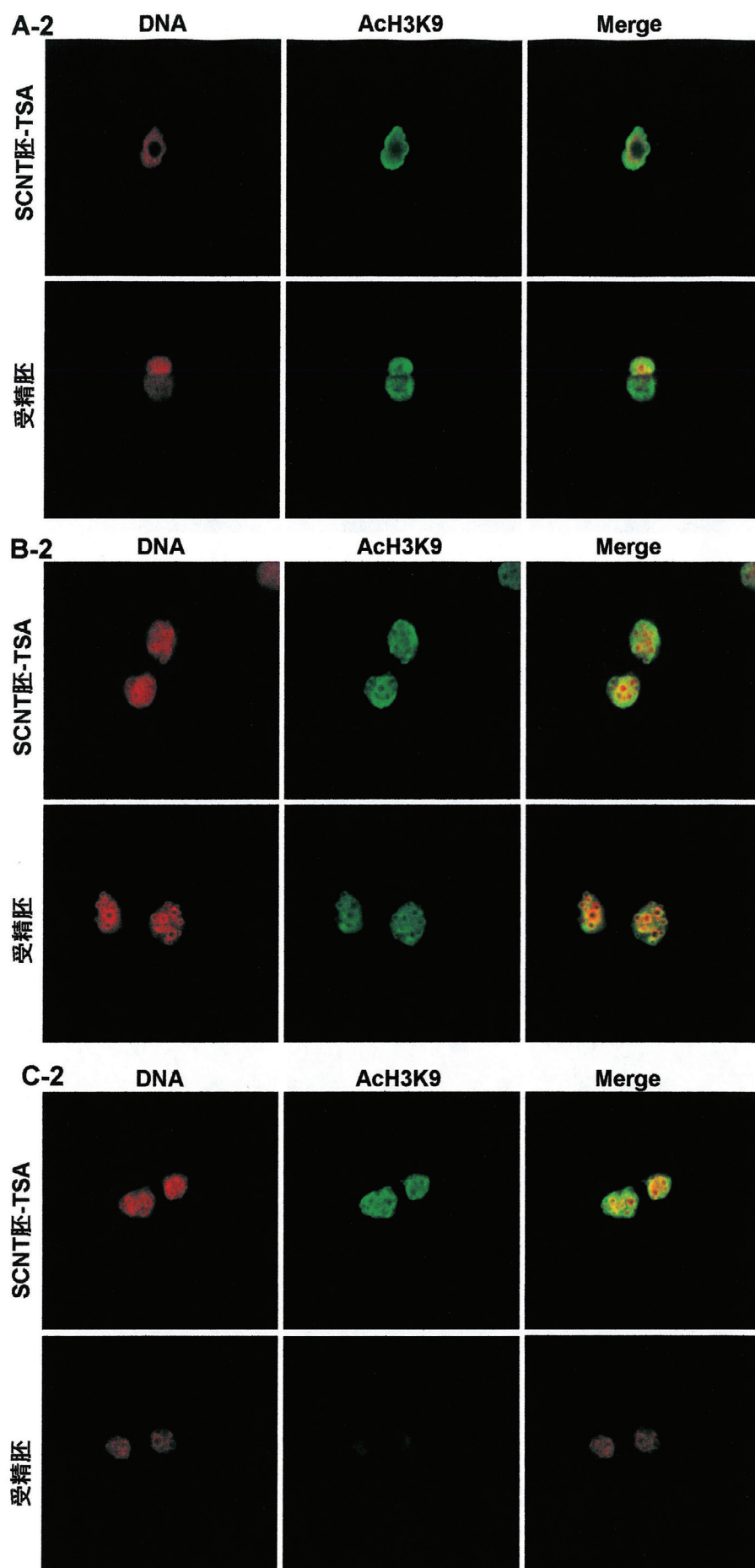


図6. ラットSCNT胚における各ステージのアセチル化ヒストンH3の免疫蛍光染色像. A-1, 2: 前核期, B-1, 2: 早期2細胞期, C-1, 2: 後期2細胞期. SCNT胚, 体細胞核移植胚; SCNT胚-TSA, TSA処理SCNT胚; AcH3K9, アセチル化ヒストンH3 lysine 9.

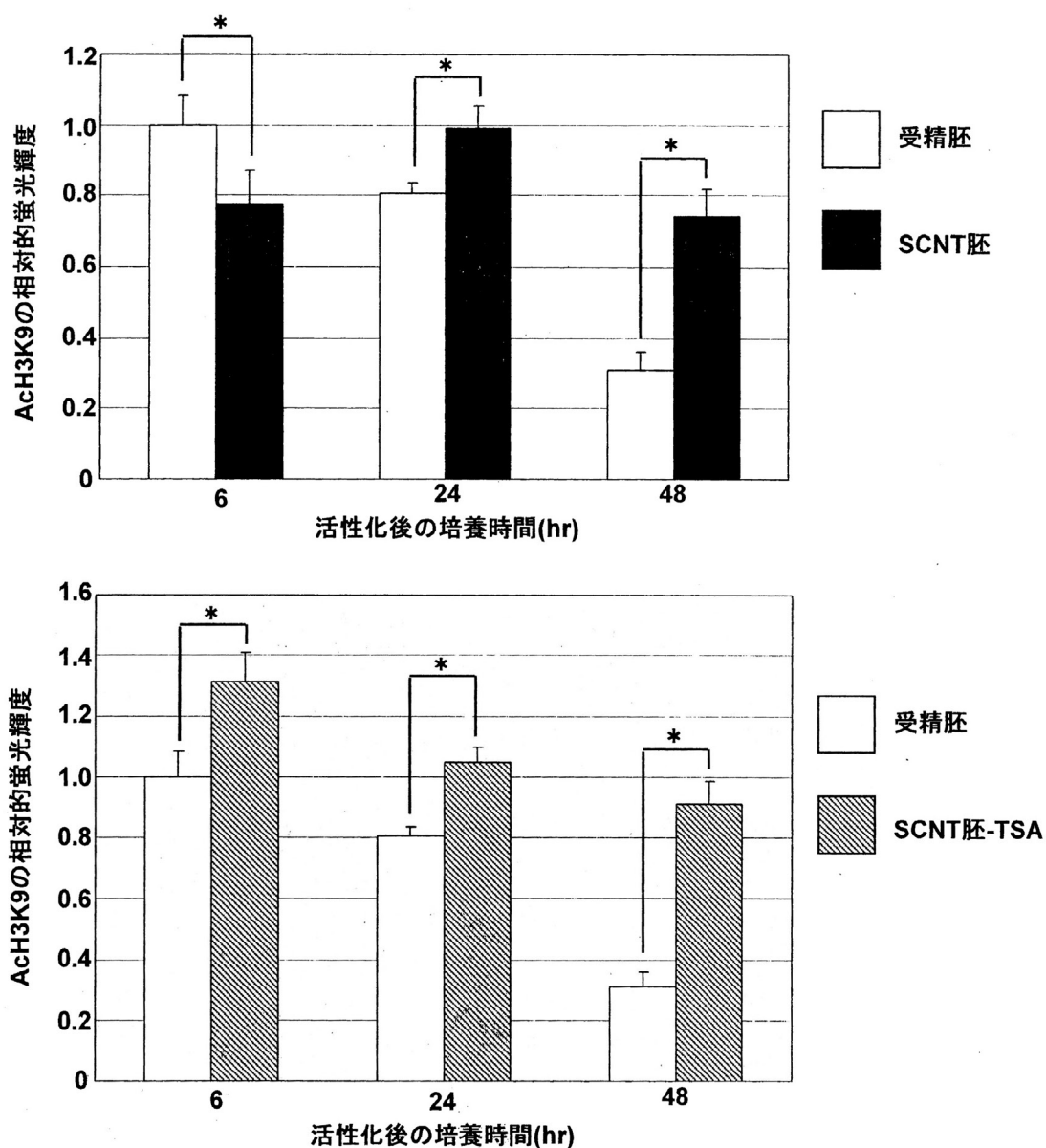


図7. TSA処理が各ステージにおけるヒストンH3アセチル化レベルに及ぼす影響. SCNT胚, 体細胞核移植胚; SCNT胚-TSA, TSA処理SCNT胚; AcH3K9, アセチル化ヒストンH3 lysine 9. 受精胚の前核期の平均輝度を1とした相対値でプロットした. 各項目内で有意差($P < 0.05$). 値は平均値 \pm S.D.

表6. TSA処理がラットSCNT胚の体外発生能に及ぼす影響

TSA濃度(nM)	作製したSCNT胚数	前核形成(%)	各ステージに発生したSCNT胚数 (%)	
			2細胞	4細胞
0	36	29 (80.6)	20 (55.6)	0 (0)
5	35	27 (77.1)	20 (57.1)	1 (2.9)

論文審査結果要旨

本研究はラット体細胞核移植（SCNT）胚の体外培養下における発生能に影響を及ぼす要因を解明することを目的とした。

まず、ブタ第二減数分裂中期（MII 期）卵母細胞をレシピエントとし、ラット体細胞（胎子胎子線維芽細胞ないし卵丘細胞）をドナーとした異種間体細胞核移植（iSCNT）胚が胚盤胞期まで発生することを示すとともに、その平均細胞数は、ドナーに胎子線維芽細胞（green fluorescent protein, GFP で標識したもの）を用いた場合、有意に高いことを示した。さらに、正常な紡錘体形成の出現率においても、胎子線維芽細胞を用いた場合に有意に高い値を示すことを確認し、ラット体細胞核は胚盤胞期までの発生能を有していることを明らかにした。またラット SCNT 胚が胚盤胞期まで発生を進行させるためには、正常な早期染色体凝集（PCC）および紡錘体形成を誘起することが重要であることを明らかにした。

ラット SCNT 胚において融合後 1 時間までに核膜崩壊（NEBD）が誘起され、さらに融合後 4.5 時間までに PCC および紡錘体形成が進行することを観察した。以上のようにラット SCNT 胚において正常な PCC および紡錘体形成が認められることから、発生停止の主要な要因はこれらの異常ではないと推察した。

ラット SCNT 胚のヒストンアセチル化状態は受精胚と異なっており、トリコスタチン（TSA）処理によって、前核期におけるヒストンアセチル化レベルを受精胚に近づけることが可能であることを示した。さらに TSA 処理により SCNT 胚が 4 細胞期まで発生することを示し、ヒストンアセチル化状態の異常が、体外発生能低下の一因であると推察した。

本研究は、iSCNT 技術を用いることにより、ラット SCNT 胚の発生能が改善されることやヒストンアセチル化状態が体外発生に影響することを示した。本研究で得られた成果は、ラット体細胞クローン個体作出に一步近づける成果と評価される。よって博士(農学)の学位を授与できるものと判断した。